

ヤリタナゴの嗅球脳波記録の試み

藤本正昭¹・前川清人^{2*}・松島治²・松田征也³

Recording of EEG from the olfactory bulb of the bitterling,
Rhodeus lanceolatus

Masaaki FUJIMOTO¹, Kiyoto MAEKAWA^{2*}, Osamu MATSUSHIMA² and Masanari MATSUDA³

¹Department of Biological Science, LES, Shimane University

²Department of Biological Science, Faculty of Science, Hiroshima University

³Lake Biwa Musium, Ohtsu

*Present address: Department of Biology, The University of Tokyo

Abstract The electroencephalogram (EEG) of olfactory bulb were recorded from the bitterling, *Rhodeus lanceolatus* in order to investigate the characteristics of the odor substance released from mussels. Male fish with nuptial color responded to water in which live mussel colony had been placed (mussel water) with a high-amplitude burst. Although some kinds of amino acids were found in the mussel water, their concentrations were too thin to induce burst activity.

Key word: bitterlings, egg-laying behavior, bivalve, olfactory bulb, amino acids

¹島根大学生物資源科学部生物科学科

²広島大学理学部生物科学科

³琵琶湖博物館

*現在の所属：東京大学大学院理学研究科

はじめに

嗅覚は動物の生活における重要な情報源の1つである。例えば蛾の仲間はフェロモンをたよりにパートナーを探し出す。水中という環境には多くの化学物質が溶解しており、魚にとっては化学感覚が欠くべからざるものとなっており、とりわけ、摂餌と繁殖には重要である。例えばある種の魚は繁殖期に prostaglandin-Fs (PGFs) を放出し、それにより産卵行動が誘発される (Sorensen, 1992)。

淡水魚タナゴ類は繁殖期になると、オスでは美しい婚姻色が現われ、メスでは産卵管が伸張する。タナゴは淡水産二枚貝の鰓に産卵する。まず最初に、オスはあたかも貝の匂いをかいているかのような仕草を示す (オスによる貝確認行動)。そしてメスと貝との間を行き来しメスを貝に導く。貝を確認したメスは長い産卵管を貝の出水管に挿入し産卵する。その直後にオスは入水管付近に放精し、貝の内部で受精が起こる。

タイリクバラタナゴと模型の貝を用いて太田等は、貝の何らかの匂いが最初のオスの仕草の引き金になると報告している (太田・真野, 1983; 太田・小倉, 1986)。すなわち単に貝殻や貝の模型を置いただけではオスは何ら興味を示さず、出水管に似せた管から水流を起こすことが必要であった。さらにこの水流に貝の飼育水を用いると、産卵するケースもみられた。このことから、タナゴ類では嗅覚により産卵行動が誘発されていると想定されている。

脊椎動物では嗅上皮の嗅細胞で得られた嗅覚情報は嗅神経を通過して嗅球に達し、そこで中枢へ向かう神経とシナプスする。この嗅球表面から細胞外電極を用いて、嗅覚刺激に対する嗅球脳波 (EEG) を記録することが可能である (Hara *et al.*, 1965; Ueda *et al.*, 1971)。著者等は、ヤリタナゴの嗅上皮に与えた貝の飼育水が嗅球脳波にバースト状の応答を引き起こすことを見出したので報告する。

材料及び方法

材料のヤリタナゴ (*Rhodeus lanceolatus*) オス 44 匹はペットショップで購入あるいは琵琶湖博物館より提供されたものを用いた。これらの魚は繁殖期の環境を模するため水温 20°C, 及び 1 日の明暗周期の比が 13 : 11 となるように照明された水槽中で飼育し, 市販の粒餌を与えた。実験には婚姻色の明らかな成熟オスを用いた。まず魚を氷水中に入れ低温麻酔を施した後, リンガー液に溶解したクラレ (150 $\mu\text{g/ml}$) 30 μl を腹腔内に注射して不動化した。その後迅速に記録用プラスチック容器に移し, 口に挿入したテフロン管から十分に空気の溶けこんだ汲み置き水を 6-8 ml/min の速度で灌流することにより人口呼吸した。この状態で開頭手術を行い嗅球を露出した。

嗅球 EEG は直径約 400 μm の Ag/AgCl 球状電極 (銀球電極) を嗅球表面に当てて記録した。不関電極および接地電極は Ag/AgCl 線で, 前者は開頭部の端に, 後者は背部の表面にセットした。これらの電極は RC 結合の前置増幅器 (日本光電, AVB-8, 帯域 0.5-30 Hz) に接続し, オシロスコープ (菊水, DSS5020A) で波形の観察を行うとともに, ペンレコーダー (グラフィック, WR3310) による記録を行った。波形の積分には時定数を 2 秒に設定した自家製積分器を用いた。

鼻孔には試験水をテストする 3 秒間以外は常時汲み置き水あるいは魚飼育水 (後出) を順応水として注入し続けた。これらは拍動ポンプにより 0.8-1.0 ml/min の流速で嗅球 EEG 記録側の鼻孔に注入した。同じ標本で実験を繰り返す場合, 一度試験水を与えた後は, 3 分間の間隔をとった。二枚貝 (ドブガイ, *Anodonta woodiana*) は広島県黒瀬町で採集した。魚飼育水は 60 リットル水槽に 20 匹の魚を飼育中のもの, 貝飼育水は容量 3 リットルの水槽に 4-6 匹のドブガイを 2-3 日間飼育したものである。

貝の飼育水を 400 倍に濃縮し, 使い捨ての C-18 カートリッジカラムに通し, 素通り分画及び保持分画それぞれを精製水で元の容量にまで希釈したものについても EEG 記録を行った。素通り分画については, アミノ酸の存在を調べるため HPLC (島津, LC-9A) による分析を行った。用いたアミノ酸試薬 (セリン, グリシン, アラニン, バリン) は全て和光純薬工業製である。

結果及び考察

まず静止状態における EEG 記録を行った。この状況下では振幅約 50 μV , 周波数 15 Hz の律動的な振動波が観察された (図 1)。貝飼育水に切り替えると, 静止時の 2-3 倍の振幅のバースト波が生じた。このバーストは切り替え後 1-1.5 秒後に最大となり以後徐々に減衰した。

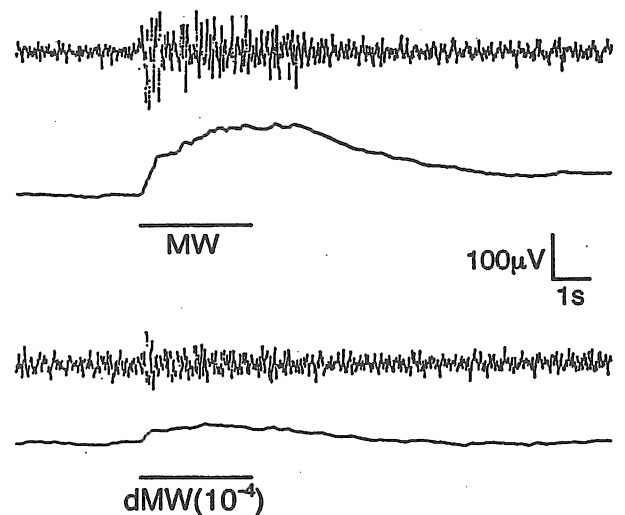


図 1 貝飼育水 (MW) 及び希釈した貝の飼育水 (dMW) により誘発されたヤリタナゴ嗅球 EEG バースト応答。婚姻色を呈しているオスから記録し, 嗅上皮は汲み置き水で順応させておいた。上段の記録は電氣的活動 (EEG)。下段はそれを時定数 2 秒で積分したもの。最下段の線は試験水の投与期間を示す。

この飼育水を 1 万倍に希釈して与えても振幅は小さいが同様な応答が見られた。試験水として汲み置き水あるいは貝飼育水を用いそれらに切り替えた場合にはこのようなバーストは観察されなかった。Ohta 等 (1992) は貝飼育水が同属のタイリクバラタナゴ (*R. ocellatus ocellatus*) の嗅球 EEG を増大することを最初に記載しており, ヤリタナゴを用いた本実験の結果はこの現象を確認するものとなった。これら両実験では嗅球 EEG の記録の可能性を探るため試験水として貝飼育水を用い, それに対応する形でバーストの発射を確認しているが, これは単に魚が貝の何らかの匂いを認識できることを意味しているものであり, 直ちに繁殖行動に結びつけるわけにはいかない。このためには, 生きている貝の排水管から放出される水だけを集めて分析するなど方法の改善が必要である。

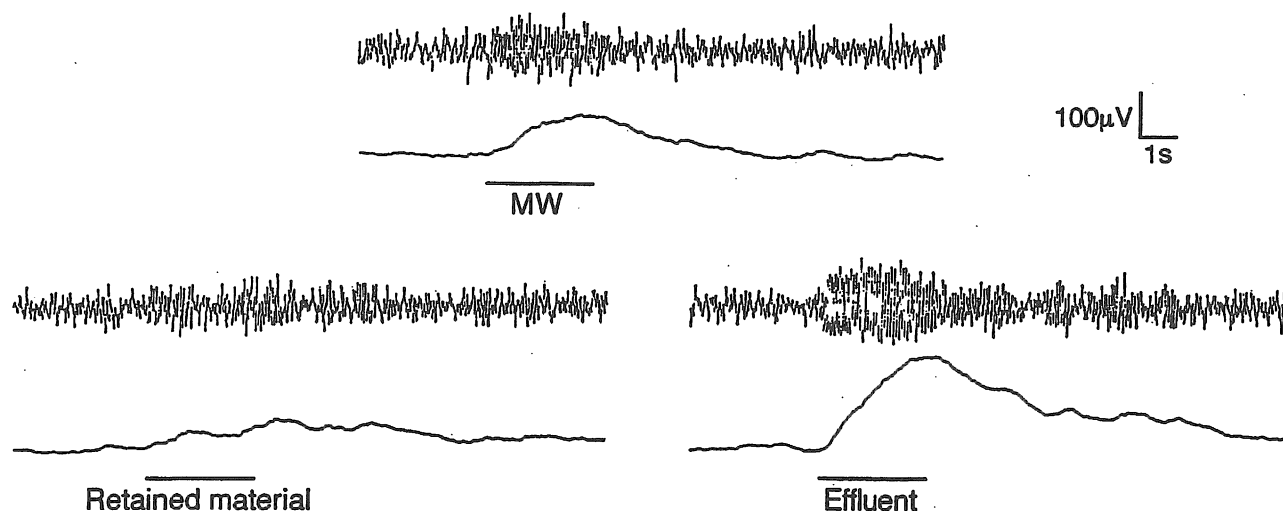


図2 貝の飼育水 (MW), C-18 カラムによる素通り分画 (Retained material), 及び保持分画 (Effluent) によるバースト応答. 各波形の説明は図1参照.

一般に EEG の記録では異なる匂い刺激に対して、嗅球上の異なった場所では異なった応答を引き起こす場合が多い。本実験では直径約 $400 \mu\text{m}$ の球状電極を用いたが、これはタナゴ類のような小型の魚では嗅球表面の殆どを覆い尽くす大きさであり、記録場所はほぼ一定しているといえる。しかしながら、異なった刺激に対する空間的な感度の違いがない嗅上皮からの細胞外記録 (嗅電図, EOG) を行い確認することが望ましい。

バーストは、また、C-18 カラムの素通り分画及び保持分画でも起こり、前者による応答は後者より大きい (図2)。HPLC 解析によると、貝飼育水には 10^{-8} M のオーダーのセリン、グリシン、アラニン、バリンが含まれていることが判明した。しかしながら、この濃度のこれらのアミノ酸は EEG バースト応答を起こさなかった。魚は1万倍に希釈した水にも応答しているので、もしもこれらのアミノ酸に応答したと仮定するとその濃度は 10^{-12} M となる。一方、貝飼育水によるバーストと同じ振幅のバーストを起こすこれらアミノ酸の濃度を調べると、 10^{-3} M の濃度を必要とすることが分かった。Hara (1994) による電気生理学的研究では30種の魚類のアミノ酸刺激による応答の平均的閾値は 10^{-9} から 10^{-7} M と報告されており、 10^{-12} M という値は低すぎる。すなわち、バースト発生に係る匂いがアミノ酸である可能性は低いと考えられ、もしもバーストが繁殖行動に直接対応したものであるとしても、アミノ酸がオスによる最初の貝確認行動の誘因物質であるとは考えにくい。

Kawabata 等 (1992a, b) はオスの成熟バラタナゴはある種のアミノ酸を封入した透析チューブに煮かれ、そ

れをつつき、場合によっては放精を起こすと報告している。しかしながら、このチューブ内のアミノ酸の最低濃度は 2×10^{-3} M であり、上述の結果によりこれも貝の放出するアミノ酸濃度と比較すると高すぎる。したがって、この濃度のアミノ酸によって誘発されるのはオスによる最初の貝確認行動ではなく、メスによる産卵直後の放精行動を誘発する要因と考えられる。最近、彼らはメスの産卵時にオスの放精を誘起する性フェロモンを回収している (川端・会田, 1998)。

次に貝飼育水中の刺激成分が揮発性のものであるか調べるため、15分間沸騰させた。その蒸発分を汲み置き水、魚飼育水あるいは精製水で補ったものを用いて

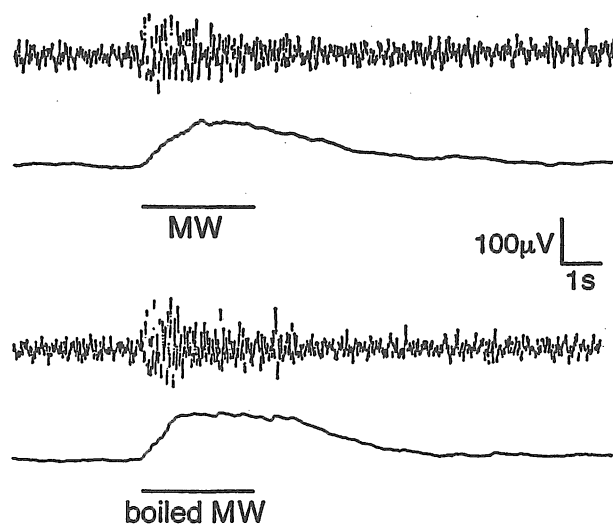


図3 貝飼育水 (MW) 及び15分間沸騰させた貝飼育水 (boiled MW) によるバースト応答. 各波形の説明は図1参照.

EEGを調べたが、いずれも明らかなバーストを生じた(図3)。この結果から、バーストを引き起こす物質は非揮発性の物質と想定される。しばしば、このような煮沸した貝飼育水やHPLCによる素通り分画の方が、未処理の貝飼育水よりも大きなバーストを引き起こす場合が見られた。魚は種々の匂い物質に対して感受性を有しており、特に貝の代謝による窒素化合物等との間で何らかの干渉が生じていることも考えられる。アミノ酸の実験についても、単一のアミノ酸だけでなく、種々のアミノ酸を組み合わせてその応答を検討する必要もある。

本実験では嗅球が貝飼育水に反応し EEG バースト発射が発生することを確認したが、今後、この現象とこの魚特有の繁殖行動とを結びつけるギャップを埋める必要がある。

謝 辞

本研究を行うにあたり、多くの情報を頂きました愛知教育大学太田忠之教授に感謝いたします。

引用文献

- Hara, T. J., The diversity of chemical stimulation in fish olfaction and gustation. *Rev. Fish Biol. Fisheries*, 4: 1-35, 1994.
- Hara, T. J., K. Ueda and A. Gordman, Electroencephalographic studies of homing salmon. *Science*, 149: 884-885, 1965.
- 川端孝一・会田勝美, 人工ダミー貝を用いたタイリクバラタナゴの産卵行動パターンおよび産卵誘導因子の解析. *日本動物学会第9回大会予稿集*: 73, 1998.
- Kawabata, K., S. Sudo, K. Tsubaki, T. Tazaki and S. Ikeda, Effects of amino acids on pecking behavior of the rose bitterling *Rhodeus ocellatus ocellatus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 833-838, 1992.
- Kawabata, K., K. Tsubaki, T. Tazaki and S. Ikeda, Sexual behavior induced by amino acids in the rose bitterling *Rhodeus ocellatus ocellatus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 839-844, 1992.
- Ohta, T., M. Fujimoto, O. P. Saxena and M. Monguchi, Morphological and electrophysiological studies on the olfactory organ of the freshwater teleost, *Rhodeus ocellatus ocellatus*, with a particular reference to its egg-laying behavior. *Bull. Aichi Univ. Edu.*, 41: 101-111, 1992.
- 太田忠之・真野英敏, 教材用生物としてのタナゴ II. 産卵行動の面から. *教材生物ニュース*, 95: 112-116, 1983.
- 太田忠之・小倉孝之, 教材用生物としてのタナゴ III. 産卵行動の面から(続). *愛知教育大学理科教育センター研究報告*, 10: 161-164, 1986.
- Sorensen, P.W., Hormones, pheromones and chemoreception. In Hara, T. J. (eds.), *Fish Chemoreception*. Chapman & Hall, London, pp. 199-228, 1992.
- Ueda, K., T. J. Hara, M. Satou, and S. Kaji, Electrophysiological studies of olfactory discrimination of natural waters by hime salmon, a land-locked pacific salmon, *Oncorhynchus nerka*. *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo. Sec. IV*, 12: 167-182, 1971.